



CRACチャネルの活性化とユージノールの効果

著者	伊藤 寿浩
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	歯博第651号
URL	http://hdl.handle.net/10097/56985

氏 名 (本籍) : 伊 藤 寿 浩

学 位 の 種 類 : 博 士 (歯 学) 学 位 記 番 号 : 歯 博 第 6 5 1 号

学位授与年月日 : 平成 25 年 9 月 25 日 学位授与の要件 : 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 ・ 専 攻 : 東北大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯科学専攻

学 位 論 文 題 目 : CRAC チャンネルの活性化とユージノールの効果

論文審査委員 : (主査) 教授 若 森 実
教授 市 川 博 之 教授 正 木 英 二

論文内容要旨

ユージノールは歯髄鎮静・鎮痛作用と消毒作用があり、臨床では酸化亜鉛ユージノールセメントとして仮封、直接覆髄法、間接覆髄法に用いられる。ユージノールは電位依存性 Na^+ チャンネル、 K^+ チャンネル、 Ca^{2+} チャンネルや P_{2X} 受容体の機能を抑制すること、カプサイシン受容体を遮断することが報告されている。歯髄充血や単純性歯髄炎などでは血管透過性が亢進し、閉鎖空間である歯髄腔内圧が高まることで歯の痛みは惹起される。血管拡張と血管透過性の亢進は神経性の調節の他、炎症性ケミカルメディエーターであるヒスタミン、セロトニン、ブラジキニン、カリジンやプロスタグランジンが引き起こす。炎症局所ではアラキドン酸の生成と代謝が亢進し、肥満細胞からの脱顆粒によりヒスタミンが遊離されている。アラキドン酸生成酵素ホスホリパーゼ A_2 の活性や脱顆粒には細胞内でのカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度上昇が必要である。興奮性細胞に見られる電位依存性 Ca^{2+} チャンネルやリガンド作動性 Ca^{2+} 透過型チャンネルとは異なり、非興奮性細胞では細胞内 Ca^{2+} ストアが枯渇した時に開口する CRAC チャンネルが細胞外から細胞内へ Ca^{2+} を流入させて、 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こしていると考えられる。現在までに CRAC チャンネルに対するユージノールの効果を検討した報告はない。本研究では肥満細胞のモデル細胞としてヒスタミン遊離の実験に用いられている Rat Basophilic Leukemia 2H3 (RBL-2H3) 細胞に発現する CRAC チャンネルを介する Ca^{2+} 流入を惹起して、活性化経路を確認した。最後に、ユージノールの CRAC チャンネルに対する作用を検討した。

RBL-2H3 細胞は抗 DNP-IgE を含む培養液中で 16 時間、 37°C で培養後、DNP-BSA を投与して、CRAC チャンネル電流を記録した。CRAC チャンネル電流の 2 つの特徴が綺麗に認められた。つまり、電流 - 電圧関係が内向き整流性を示し、逆転電位が 50 mV より脱分極側にあった。M1 受容体を強制発現させた RBL-2H3 細胞は $50\text{ }\mu\text{M}$ のカルバコールを投与しても特徴的な CRAC チャンネル電流が記録できた。更に、電極内液に IP_3 を添加し細胞内に IP_3 を灌流する、又は 10 mM BAPTA で細胞内の Ca^{2+} を

強くキレートすると CRAC チャネル電流が記録できた。

CRAC チャネル電流はフェノールでは抑制できなかったが、ユージノールでは 0.1 mM~2 mM の狭い範囲で、濃度依存的に CRAC チャネル電流は抑制された。ユージノールの IC_{50} 値は 0.54 mM, ヒル係数は 2 であった。この IC_{50} 値は電位依存性 Na^+ チャネルと電位依存性 K^+ チャネルの IC_{50} 値と同程度であり、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの IC_{50} 値より小さかった。歯科においてユージノールは歯髄の鎮痛・鎮静効果があるとして用いられてきたが、炎症時に活性化する CRAC チャネルによる Ca^{2+} 流入を抑制することが薬理作用機序のひとつである可能性が示唆された。

審査結果要旨

ユージノールは歯髄鎮静・鎮痛作用と消毒作用があり、臨床では酸化亜鉛ユージノールセメントとして仮封、間接覆髄法に用いられている。近年の分子生物学の進歩と電気生理学や生物化学の進歩により、痛覚受容に関わる分子に対するユージノールの分子薬理学的研究が可能になった。例えば、ユージノールが電位依存性 Na^+ チャネル、電位依存性 K^+ チャネル、電位依存性 Ca^{2+} チャネルや P_{2X} 受容体を抑制する他、カプサイシン受容体 (TRPV1 チャネル) を遮断することにより鎮痛作用がもたらされると報告されている。しかし、歯髄鎮静作用に関しては余り研究が進んでいない。例えば、歯髄充血や単純性歯髄炎などでは血管が拡張し血管透過性が亢進すると考えられる。血管拡張と血管透過性の亢進は神経性の調節の他、炎症性ケミカルメディエーターであるヒスタミン、セロトニン、ブラジキニン、カリジンやプロスタグランジンが引き起こす。炎症局所ではアラキドン酸の生成と代謝が亢進し、肥満細胞からの脱顆粒によりヒスタミンが遊離される。アラキドン酸生成酵素ホスホリパーゼ A_2 (PLA₂) の活性や脱顆粒には細胞内でのカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度上昇が必要である。電位依存性 Ca^{2+} チャネルやリガンド作動性 Ca^{2+} 透過型チャネルを欠く非興奮性細胞では、細胞内 Ca^{2+} ストアが枯渇した時に開口する Ca^{2+} -release-activated- Ca^{2+} (CRAC) チャネルが細胞外から細胞内へ Ca^{2+} を流入させ、 Ca^{2+} 濃度を上昇させると考えられる。現在までに CRAC チャネルに対するユージノールの効果を検討した報告はない。

本研究では肥満細胞のモデル細胞としてヒスタミン遊離の実験に用いられている Rat Basophilic Leukemia 2H3 (RBL-2H3) 細胞を抗 DNP-IgE で感作後、DNP-BSA を投与して CRAC チャネル電流をパッチクランプ法を用いて記録した。更に、①細胞内に IP_3 を灌流する、② RBL-2H3 細胞にムスカリン M1 受容体を発現させカルバコールを投与する、③ BAPTA で細胞内の Ca^{2+} をキレートすると、CRAC チャネルが活性化された。これらの結果から、B 細胞刺激後、PLC γ 2 を介して産生された IP_3 により細胞内 Ca^{2+} ストアが枯渇し、CRAC チャネルが活性化されることが確認された。更に、 IP_3 により活性化された CRAC チャネルをユージノールが濃度依存的に抑制した。ユージノールに対する親和性は K^+ チャネル > CRAC チャネル > Na^+ チャネル > P_{2X} 受容体 > Ca^{2+} チャネルの順になることが示された。

これまで歯科臨床においてユージノールは広く用いられてきた。炎症時に活性化する CRAC チャネルによる Ca^{2+} 流入を抑制することがユージノールの薬理作用機序のひとつである可能性が示唆され、歯科薬理学の発展に貢献するものである。よって本論文は、博士 (歯学) の学位に相応しい論文と判断するものである。